

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ ХЛОРЕЛЛЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ АЛКИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МОЧЕВИНЫ

К. В. КВИТКО, В. И. ХРОПОВА

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Широкое внедрение в сферу человеческой деятельности синтетических химических препаратов делает одной из важнейших задач выявление их потенциальной мутагенной активности. Разнообразие объектов и способов тестирования увеличивает гарантию всесторонней оценки таких препаратов.

Общераспространенным, но весьма трудоемким методическим приемом оценки мутагенной активности является установление числа измененных особей, отнесенного к числу выживших. Кроме трудоемкости этой методике свойственны и специфические источники ошибок, как, например, увеличение числа мутантов за счет отбирающего, а не вызывающего мутации, эффекта изучаемого агента [3]. Использование феномена индукции мутантов у микроорганизмов на плотных средах в селективных условиях при внесении агента непосредственно в чашки Петри было предложено Иером и Сцибальским [22] в качестве теста на мутабельность. В этом случае сравниваются частоты мутантных колоний в чашках Петри с равномерно распределенными клетками исходных форм на равных по площади участках газона как вблизи нанесенного мутагена, так и за пределами зоны его диффузии. При этом ошибки, связанные с отбирающим действием мутагена, могут уменьшиться, но не увеличить искомый мутагенный эффект.

Прирост числа мутантных колоний на участке, соответствующем зоне диффузии мутагена, свидетельствует о появлении ранее не существовавших мутантных потомств, т. е. об актах мутации. К настоящему времени этот тест неоднократно использовался в генетике микроорганизмов [12, 18].

Для водорослей этот тест был апробирован на аргининзависимых мутантах хламидомонады 137С [23]. Ниже приводятся результаты экспериментов, проведенных на аргининзависимых мутантах хлореллы. Они позволяют рекомендовать учет реверсий у этих штаммов в качестве простого теста для выявления мутагенной активности препаратов у фотосинтезирующих организмов. Одновременно на этих объектах удается регистрировать мутабельность по стандартному критерию «частота возникновения пигментных мутантов» [1, 2, 4, 15, 17].

Материал и методы. В данной работе использована коллекция аргининзависимых (АРГ) мутантов хлореллы, полученных после обработки раствором нитрозометилмочевина клеток прототрофного штамма В *Chlorella vulgaris* [14, 16]. Было выбрано четыре мутанта, различия между которыми определялись характером пищевых потребностей. Два мутанта АРГ-11 и АРГ-22 нуждаются только в аргинине, два других мутанта АРГ-2 и АРГ-3 нуждаются либо в аргинине, либо в орнитине. Работа с различными типами мутантов гарантировала участие в эксперименте форм, несущих мутации в разных генах по аналогии с хламидомонадой [28]. Выбранные мутанты характеризовались четкой реакцией на добавки факторов роста и давали достаточно низкий уровень спонтанных реверсий к прототрофности (менее 10^{-8} — 10^{-10} ревертантов на клетку за поколение).

Клетки ауксотрофных мутантов размножали на среде ФГА [15] с

1% аргинина: азот — в форме нитрата калия, остальные компоненты минерального раствора (Ф) соответствовали набору солей раствора Кнопа; глюкоза (Г) — 20 г на литр; агар-агар (А) — до 2%.

В качестве мутагенов использованы этильные и метильные производные мочевины (НЭМ, НММ) и нитрозогуанидин (НГ). Действие этих мутагенов сравнивали с действием пестицида диурона (ДУ). Диурон (дихлорфенилдиметилмочевина) известен как специфический ингибитор функций хлоропласта, в частности фотофосфорилирования. У эвглены ДУ уменьшает количество хлоропластной ДНК на клетку [27]. Мутагенные эффекты связаны с индукцией пигментных мутантов и мутантов устойчивости к ДУ у хлореллы [6].

Нанесение мутагена в центр чашки и бумажных дисков с аминокислотами по периферии ее привело к образованию частично перекрывающихся зон диффузии. Мутагенный эффект НГ, НММ и НЭМ был приурочен к участку перекрывания зоны остаточного роста с зоной диффузии мутагена. Если мутаген и аргинин были на одном диске, это позволяло на одной чашке сопоставить эффект 4—5 препаратов. Мутагенез наблюдали в зоне остаточного роста диаметром 25—30 мм, образовавшейся при диффузии 5—10 мкг аргинина и 0,01—10 мкг испытуемого препарата из бумажного диска. Требуемую дозу получали, смачивая 100 дисков раствором аргинина и испытуемого препарата до полного впитывания влаги.

Последовательность операций была следующей. Непосредственно перед проведением эксперимента проверяли потребности штаммов в аминокислотах, для чего по краю чашки с газоном клеток на поверхности среды ФГА вносили диски, содержащие не менее 100 мкг аминокислот: аргинин, орнитин, цитрулин и любое из аммонийных соединений. Рост вокруг точек внесения только аргинина (АРГ-11, АРГ-22) или всех трех аминокислот (АРГ-2, АРГ-3) указывал на типичность культуры. Для мутационных опытов использовали методику двухслойного агара: поверх среды ФГА с 2% агара в чашку Петри наносили 10 мл полужидкой среды ФГА (агара 0,7—1,0%) с 10^7 клеток ауксотрофной культуры. Такая чашка выглядела прозрачной и после 12—16 ч инкубирования; за это время на «голодном» агаре клетки синхронизировались, превращаясь в автоспоры. Затем по периферии чашки на равном удалении друг от друга размещали аргининсодержащие диски с испытуемыми препаратами и контрольный диск, содержащий только аргинин в количестве 1—5 мкг. Этого количества было достаточно, чтобы вызвать в зоне диффузии (2,5 см диаметром) две споруляции клеток хлореллы (8—16 клеток) в течение первых двух суток. В период первой споруляции осуществлялся мутагенез во всех последовательных фазах клеточного цикла, а прохождение второй споруляции позволяло снять задержку проявления мутации структурных генов. Реализация более поздних актов мутагенеза затруднялась прекращением остаточного роста. Мутагенный эффект учитывался в баллах, для этого рассчитывали двоичный логарифм числа мутантных колоний на площади около 5 см² (зона диаметром 25 мм). Ноль или 1 мутант соответствовали нулевому баллу, 2 колонии — оценке в один балл, 3 и 4 — двум баллам, от 5 до 8 мутантов — трем баллам, от 9 до 16 — четырем, от 17 до 32 колоний — пяти и от 33 до 64 — шести баллам; случай, когда индуцировано более 64 мутантов, получал оценку в 7 баллов.

Часть экспериментов была проведена на синхронизированных культурах штамма АРГ-2. Для синхронизации культур использовали метод, предложенный Спекторовым и Линьковой [8]. Оценка степени синхронизации велась методом Энгельберга [20]. Состояние клеточных

делений контролировали на твердой среде по доле клеток, прошедших первую и вторую споруляции. Синхронные культуры шт. АРГ-2 с известной продолжительностью клеточного цикла помещали в плоскодонные колбы и выставляли на свет (освещенность 8000 лк, $t = +30^\circ\text{C}$). Через каждые 2 ч в течение всего клеточного цикла отбирали пробы по 1 мл и сливали равные объемы суспензии клеток и раствора мутагена НММ. Обработка мутагеном длилась 30 мин. В остальном детали проведения эксперимента были стандартными [13].

Результаты и обсуждение

1. Специфика мутагенеза у аргининзависимых штаммов хлореллы. Для определения специфики мутагенеза, вызванного действием НММ в концентрации $3 \cdot 10^{-2}$ М, был поставлен эксперимент на синхронной культуре ауксотрофного штамма АРГ-2. Регистрировали мутации двух разных типов: генные мутации у ауксотрофов к прототрофности и мутации, приводящие к пигментной мозаичности, генетическая природа которых еще неизвестна и которые в равной мере могут быть как плазмидными мутациями, так и результатом хромосомных аномалий. Синхронность культуры, определенная по критерию Энгельберга [20], равнялась 77,8%, что близко к степени синхронности, описанной в других экспериментах на водорослях [19] и пересчитанной этим же способом.

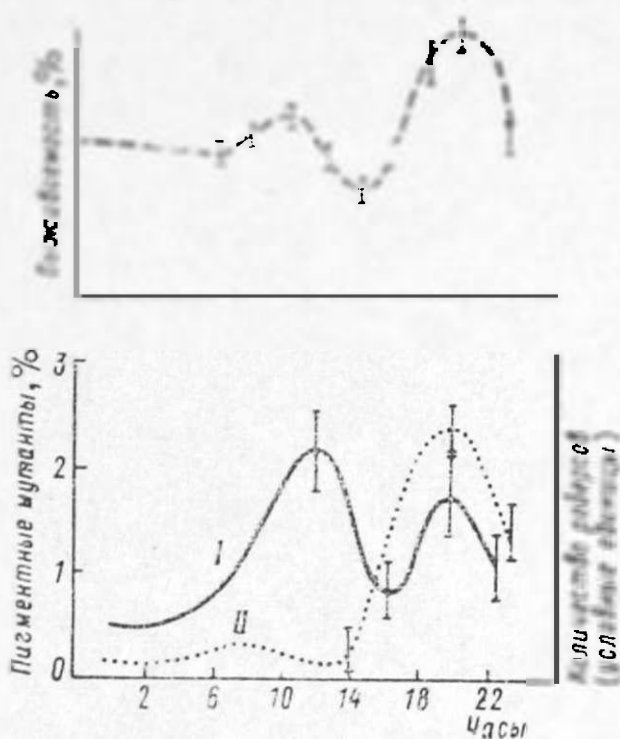


Рис. 1. Влияние нитрозометилмочевины на выживаемость и мутабельность клеток синхронизированной культуры аргининзависимого штамма хлореллы АРГ-2.

I — пигментные мутанты (мозаичного типа);
II — реверсии к прототрофности от аргининзависимости

Выживаемость и мутабельность клеток в синхронном цикле изменяются закономерно (рис. 1): вслед за падением выживаемости пик мозаичных мутантов приходится на 10—14-й ч цикла, второй пик мутабельности совпадает с уменьшением летального эффекта и приходится на 18—20-й ч цикла. Аналогичная связь изменений летальности и частоты секториальных мутаций описана у штамма ЛАРГ-1 [5, 7]. В экспериментах этих авторов первый пик мутабельности и летальности приходится на момент первой волны синтеза ДНК ядра. Особенность данного момента в том, что в это время у водорослей начинается синтез сателлитной ДНК [19, 21, 24].

Частоты появления ревертантов характеризуются одним малым и одним большим пиком. Масимум частоты реверсий совпадает по времени со вторым пиком частоты пигментных мозаичных мутантов. Этот пик соответствует периоду наиболее интенсивного синтеза ДНК (второй и третий циклы удвоения). В этот же период у другой зеленой водоросли — хламидомонады — возникают в большем количестве ядерные мутации стрептомицинустойчивости [9, 10, 23]. Малый пик мутабельности, приходящийся на 6—8-й ч клеточного цикла (см. рис. 1),

Частоты появления ревертантов характеризуются одним малым и одним большим пиком. Масимум частоты реверсий совпадает по времени со вторым пиком частоты пигментных мозаичных мутантов. Этот пик соответствует периоду наиболее интенсивного синтеза ДНК (второй и третий циклы удвоения). В этот же период у другой зеленой водоросли — хламидомонады — возникают в большем количестве ядерные мутации стрептомицинустойчивости [9, 10, 23]. Малый пик мутабельности, приходящийся на 6—8-й ч клеточного цикла (см. рис. 1),

Характеристика мутабельности аргининзависимых штаммов хлореллы (АРГ-) по частоте появления реверсов в зоне диффузии мутагенов (НГ, НММ, НЭМ, ДУ)

Штамм	Условия опыта	Мутагены, вызывающие угнетение роста	Мутабельность в баллах*				
			контроль	НГ	НММ	НЭМ	ДУ
АРГ-2	Темнота, мут. 0,1 мкг	НГ, НЭМ	0	5—6	1—2	1—4	0
	мут. 3,0 мкг		0	4—5	1—4	0—3	0
	Свет, мут. 10,0 мкг		0	1—2	0—1	0—1	0
АРГ-3	Темнота, мут. 0,1 мкг	—	0	2	0	0	0
	Свет, мут. 1,0 мкг	ДУ	0	2—3	0	0	0
АРГ-11	Темнота, мут. 0,1 мкг	—	0—1	7	1—2	1—2	0—1
	мут. 10,0 мкг	НГ, НММ	0—1	0	0—1	7	0—1
	мут. 3,0 мкг	НГ	0—1	4—6	3—5	1—2	0—1
АРГ-22	Свет, мут. 10,0 мкг	ДУ	0	4—6	0—4	1—3	0
	Темнота, мут. 1,0 мкг	—	0	4—5	0—3	1—2	0
	мут. 3,0 мкг	НГ	0	3	1	3	0

* Оценка в баллах соответствует двойному логарифму числа реверсов на площадь 5 см².

может быть обусловлен асинхронностью репликации. Таким образом, при действии НММ реверсии к прототрофности у хлореллы возникают преимущественно в период, когда по литературным данным воспроизводится основная часть ядерной ДНК, а пигментные мутанты появляются как в это же время, так и раньше. У хламидомонады при изучении частот возникновения мутаций ауксотрофности и ацетатзависимости, индуцированных НГ, также были обнаружены два пика мутабельности [26]: первый — в интервале 6—9 ч, по Хауэлу, в этот период синтезируется ДНК рибосомных полигенов [21], второй — в интервале 16—19 ч. Именно в этот период преимущественно возникали мутации ауксотрофности. Мутации ацетатзависимости чаще всего появлялись в период первого пика, а они по своей природе являются изменениями регуляторных генов.

2. Сравнение мутагенного эффекта диурона и стандартных мутагенных препаратов (НЭМ, НММ, НГ) диффузным способом. В таблице приведены результаты опытов, каждый из которых был поставлен в трех повторностях. Относительно малые размеры зон диффузии тестируемых препаратов позволили на одной чашке сопоставлять эффект четырех веществ и контрольного диска на клетки одного штамма. В зонах контрольных дисков изредка встречаются по 1—2 ревертанта (0—1 балл) для штамма АРГ-11. У других штаммов в контрольных дисках почти не встречались ревертаны (балловая оценка — 0).

Три мутагена (НГ, НЭМ и НММ) вызывали на 7—8-й день инкубации появление колоний от ревертировавших клеток в зоне стимуляции роста. Эти колонии были видны как темно-зеленые вкрапления в участках размножения ауксотрофных клеток. Для НММ было характерно появление ревертантов в зоне остаточных делений и значитель-

но меньшая частота их встречаемости в удаленных от места нанесения аргинина участках чашки Петри. Реверсов в зоне диффузии ДУ не найдено, если не считать вариант АРГ-11, где оценка была 0—1, как и в контроле (рис. 2).

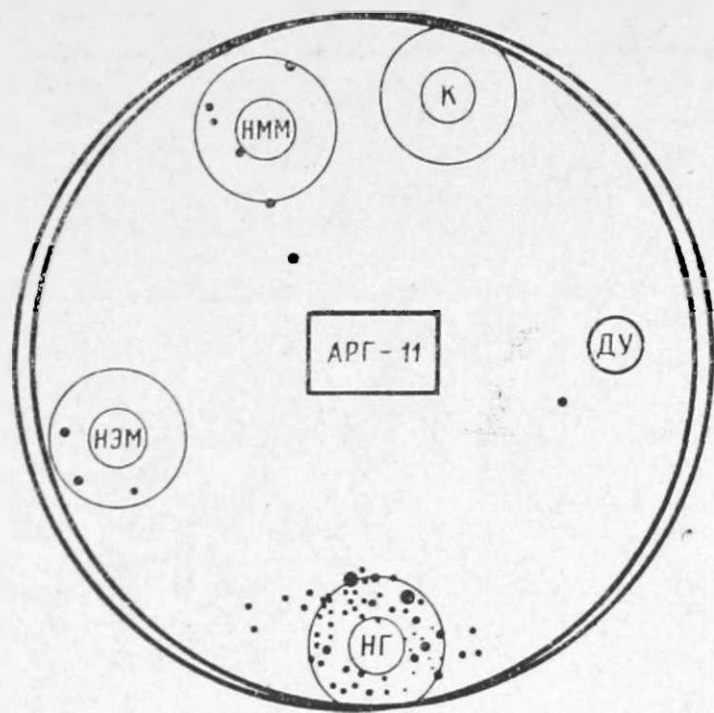


Рис. 2. Качественный тест на мутагенную активность водорастворимых веществ по частоте появления колоний ревертантов у штамма АРГ-11 в зоне диффузии агента.

Вносили по 10,0 мкг аргинина и по 1 мкг мутагена (НММ, НЭМ, НГ, ДУ) на каждом диске. Верхний диск содержит только аргинин — контроль (К). Чашка инкубирована на свету и ДУ подавляет рост в зоне диффузии аргинина.

почти полностью перекрывается зоной ингибирования для НГ и на $\frac{1}{3}$ для НММ и НЭМ. В этих случаях реверсы появляются за пределами зоны ингибирования и окружают диск кольцеобразной зоной. Определенные для этих условий оптимальные дозы составили 1,0—10 мкг на диск для НММ и НЭМ и 0,1—1,0 мкг для НГ.

Свет разрушает данные мутагены и одновременно способствует выживанию водорослей, что проявляется в уменьшении зоны ингибирования.

Ингибирование диуроном роста водорослей усиливается на свету, но при этом не наблюдается мутагенеза. Специфичность генетического действия ДУ на водоросли, проявляющегося лишь в индукции пигментных мутаций, может быть связана с цитогенетическим механизмом его эффекта. Проверка этого предположения сейчас становится возможной, так как создана коллекция штаммов хламидомонады, в различной степени устойчивых к данному гербициду [11, 25]. На основе этой коллекции нами получены диплоиды, в разной степени устойчивые к ДУ, что позволяет изучить эффекты ДУ как на геномные, так и оргanelльные детерминанты.

Таким образом, диффузионный тест подтвердил пригодность аукоотрофных мутантов хлореллы для изучения мутагенных эффектов пестицидов на водоросли по тесту «частота реверсии к прототрофности». Для гербицида диурана показано отсутствие эффекта по критерию «частота ревертирования к прототрофности».

ВЫВОДЫ

1. Предложен простой способ оценки мутагенной активности препаратов на клетках хлореллы как представителя фотосинтезирующих организмов.

2. Все исследованные препараты, кроме ДУ, эффективны в индукции мутаций всех типов. ДУ не вызывает появления реверсов от АРГ⁻ к АРГ⁺ у хлореллы.

Summary

A modification of spot — testing procedure for evaluation of mutagenic effects of chemicals on green algae was proposed. The frequency of reversion from arginindependence to prototrophy was determined for number of auxotrophic mutants. The several substances could be tested on the same Petry dish with a layer of a suspension of auxotrophic cells in semisolid agar on surface of minimal media. The mutagens in paper disks were applicated together with trace of arginine (the growth factor). The latter one allows to pass the two sporulation of cells and enable the appearance of induced mutations in form of clones with changed phenotype (prototrophic). The experiments with synchronous culture of ARG-2 mutant give some indication on chromosomal localization of reversions from arginindependence to a prototrophic state.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аникеева М. Д., Шевченко В. А., Ваулина Э. Н. Действие этиленмина на хлореллу. — В кн.: Экспериментальный мутагенез у микроорганизмов и его практическое использование. М., 1966, с. 149—157.
2. Ваулина Э. Н., Аникеева И. Д., Коган И. Г. Действие факторов внешней среды на одноклеточную зеленую водоросль — хлореллу. — В кн.: Генетические последствия загрязнения окружающей среды. М., 1977, с. 80—88.
3. Захаров И. А., Квитко К. В. Генетика микроорганизмов. Л., 1967. 244 с.
4. Квитко К. В. О влиянии ультрафиолетового излучения на наследственную изменчивость хлореллы. Автореф. канд. дис., 1963. 17 с.
5. Коган И. Г. Модификация летального и мутагенного действия ионизирующих излучений на разных стадиях клеточного цикла хлореллы. Автореф. канд. дис. М., 1970. 26 с.
6. Мухамадиев Б. Т., Квитко К. В., Заленский О. В. Мутанты хлореллы, устойчивые к ингибитору фотофосфорилирования DCMU-3 (3,4)дихлорфенил-1-диметилмочевине. II. Мутагенное действие DCMU на различные штаммы. — Генетика, 1971, т. 7, № 5, с. 36—41.
7. Пятышев Д. Р. Изучение мутагенеза на разных стадиях клеточного цикла у хлореллы с помощью теста секторных мутантных колоний. Автореф. канд. дис. М., 1970. 32 с.
8. Спекторов К. С., Линькова Е. А. О новом упрощенном методе синхронизации культур хлореллы. — Радиобиология, 1964, т. 5, вып. 2, с. 253—256.
9. Тугаринов В. В., Столбова А. В., Хо Ф. Т., Квитко К. В. Сравнение мутабельности оргanelльных и ядерных генов в различные фазы митотического цикла *Chlamydomonas reinhardtii*. — В кн.: Тезисы II съезда ВОГиС. Общая и молекулярная генетика. Вып. 2. М., 1972, с. 125.
10. Тугаринов В. В., Столбова А. В., Хо Ф. Т., Квитко К. В. Сравнение мутабельности оргanelльных и ядерных генов в различные фазы вегетативного цикла *Chlamydomonas reinhardtii*. — В кн.: Исследования по генетике. Вып. 5. Л., 1974, с. 28—35.
11. Хакимов Я. И. Характер наследования признака чувствительности клеток к диурону у хламидомонады. — В кн.: Тезисы докл. III съезда ВОГиС им. Н. И. Вавилова. Л., 1977, с. 485.
12. Хромов-Борисов Н. Н. Мутагенотипирование у дрожжей — теория и методы. — В кн.: Тезисы III съезда ВОГиС. Л., 1977, с. 491.
13. Хропова В. И. Изменчивость *Chlorella vulgaris* Beijer., индуцированная N-нитрозометилмочевинной. — В кн.: Супермутагены. М., 1966, с. 190—196.
14. Хропова В. И. Химический мутагенез как метод изучения агамноразмножающейся одноклеточной водоросли хлореллы. Автореф. канд. дис. Л., 1971, с. 21.
15. Хропова В. И., Квитко К. В., Захаров И. А. Сравнительное изучение мутагенного действия излучений и этиленмина на хлореллу. — В кн.: Исследование по генетике. Вып. 2. Л., 1964, с. 69—76.
16. Хропова В. И., Мухамадиев Б. Т. Эффект фидерства у одноклеточной водоросли хлореллы, связанный с выделением в среду аргининсодержащих пептидов. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1970, № 15, с. 133—142.
17. Шевченко В. А. Естественный и индуцированный мутационный процесс у хлореллы. — В кн.: Успехи современной генетики. Вып. 1. М., 1967, с. 246—278.
18. Ames B. N., Lee F. D., Durston W. E. An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and cancerogens. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, vol. 70, p. 783—786.

19. Chiang K. S., Sueoka H. Replication of chromosomal and cytoplasmic DNA during mitosis and meiosis in the eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. — J. Cell Physiol., 1967, vol. 70, suppl. 1,2, p. 89—112.
20. Engelberg I. Measurement of degrees of synchrony in cell population. — In: Synchrony in cell division and growth. New York, 1964, p. 497—508.
21. Howell S. H. The differential synthesis and degradation of ribosomal DNA during the vegetative cell cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Nature. New Biology, 1972, vol. 240, N 104, p. 264—266.
22. Iyer V. N., Szybalski W. Two simple methods for the detection of chemical mutagens. — Appl. Microbiol., 1958, vol. 6, p. 23—28.
23. Konvalinkova V., Matagne P. F., Loppes R. Induction and analysis of revertants from various arg-7 mutants lacking argininosuccinate lyase in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Mut. Res., 1974, vol. 24, N 1, p. 69—72.
24. Lee R. W., Jones R. F. Induction of Mendelian and non-Mendelian streptomycin resistant mutants during the synchronous cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. — Mol. Gen. Genetics, 1973, vol. 121, p. 99—108.
25. Lien S. e. a. The differential action of PS II-specific inhibitors on a DCMU-resistant mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. — Plant Physiol., 1977, vol. 59, suppl., N 6, p. 23.
26. Schimmer O., Loppes R. Forward mutations induced by nitrosoguanidine during the synchronized cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. — Mol. Gen. Genetics, 1975, vol. 138, N 1, p. 25—31.
27. Shneavour A., Ben-Shaul Y., Avron M. Structural changes in *Euglena gracilis* grown autotrophically in the light with 3(3,4-dichlorophenyl) 1,1, dimethyl urea (DCMU). — Exp. Cell. Res., 1969, vol. 58, p. 1—9.
28. Strijkert P. J., Sussenbach J. S. Arginine metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for a specific regulatory mechanism of the biosynthesis. — Europ. J. Biochem., 1968, vol. 8, N 3, p. 408—412.